

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Frýdová

Vliv palmitoylace na biologické funkce proteinů
The effect of palmitoylation on biological functions of proteins

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce
RNDr. Cyril Bařínka, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 05. 2017

Podpis

Poděkování:

Poděkování patří především mému vedoucímu práce RNDr. Cyrilovi Bařinkovi, Ph.D. za hodnotné rady a odbornou pomoc při psaní práce. Byl ochotný, velice trpělivý a šel mi vždy příkladem. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, mému příteli a všem přátelům za jejich neustálou podporu.

Abstrakt

Palmitoylace je lipidická post-translační modifikace proteinů, která se řadí mezi nejrozšířenější lipidické modifikace v eukaryotických buňkách. Na rozdíl od ostatních lipidických post-translačních modifikací je tato modifikace reverzibilní a umožňuje tak časově-prostorovou regulaci, která probíhá obdobným způsobem jako u fosforylace či ubiquitinace. Palmitoylace pak sama reguluje interakce cytosolických proteinů s membránovými doménami, zároveň hraje důležitou roli v intracelulárním přenosu a ovlivňuje konformaci a stabilitu proteinů. Patofyziologický průběh palmitoylace je spojen s několika neurodegenerativními onemocněními, jako je například Alzheimerova choroba či neuronální ceroidní lipofuscinóza.

Klíčová slova: palmitoylace, depalmitoylace, post-translační modifikace, DHHC proteinová doména, lipidická modifikace

Abstract

Palmitoylation is lipid post-translational modification of proteins. It is one of the most common protein lipidations in eukaryotic cells. Unlike other lipid post-translational modifications, palmitoylation is reversible. Its unique reversibility determines important characteristic of palmitoylation - palmitoylation can be regulated in the similar way as ubiquitination or phosphorylation. At the same time, palmitoylation regulates interactions between cytosolic and membrane domains. Palmitoylation also plays an important role in the intracellular trafficking. It also affects protein stability and protein-protein interactions. Aberrant palmitoylation is linked to several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease or neuronal ceroid lipofuscinosis.

Key words: palmitoylation, depalmitoylation, post-translational modification, DHHC protein domain, lipid modification

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Cíle práce	2
2. Palmitoylace	3
2.1. Lipidické post-translační modifikace	3
2.2. Palmitoylace a její průběh	4
3. Enzymy regulující palmitoylaci/depalmitoylaci	7
3.1. Palmitoyltransferázy	7
3.2. Thioesterázy	10
4. Vliv palmitoylace na biologické funkce proteinů	13
4.1. Vliv palmitoylačních/depalmitoylačních cyklů na biologické funkce proteinů....	13
4.2. Vliv palmitoylace na interakce s lipidovými rafty	15
5. Metody využívané pro detekci palmitoylace	17
5.1. ABE metoda	17
5.2. Metabolické značení analogem kyseliny palmitové následované klik chemií.....	19
6. Patofyziologie palmitoylace	21
Závěr	23
Seznam použitých zkratk	24
Použitá literatura.....	25

1. Úvod

Bylo to v roce 1951, kdy byla vůbec prvně popsána lipidická modifikace proteinu a to konkrétně u zdravé a nádorové mozkové tkáně (Folch et al., 1951). Samotná palmitoylace proteinu byla poprvé zaznamenána přibližně před necelými čtyřiceti lety na glykoproteinu vesikulárního stomatitického viru (VSV G) a na glykoproteinu viru Sindibis (Schmidt et al., 1979). Tehdy v roce 1979 byla palmitoylace detekována pomocí radioaktivně (tritium) označeného palmitátu, který takto označený byl zařazen do metabolismu živé buňky a následně byl detekován. Po několik následujících desetiletí to byl jediný možný způsob detekce palmitoylace. Studium palmitoylace proteinů bylo po dlouhou dobu značně omezeno, jelikož tato metoda neposkytovala dostatečně spolehlivé informace o rozsahu palmitoylace a v buňkách s velmi nízkou hladinou exprese palmitoylovaných proteinů nebyla tato modifikace vůbec detekována (Drisdel and Green, 2004).

V roce 2004 však byla vyvinuta acyl biotinová výměna ("acyl biotin exchange", zkráceně ABE) (Drisdel and Green, 2004). Metoda ABE umožnila přesnější detekci palmitoylovaných proteinů ve velkých proteinových komplexech či dokonce tkáních (Drisdel and Green, 2004) a došlo tak k velkému kroku vpřed. Propojení metody ABE s hmotnostní spektrometrií následně umožnilo detailní charakterizaci palmitoylovaných proteinů v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Roth et al., 2006). Do té doby bylo známo 12 palmitoylovaných proteinů a tato studie zcela nově identifikovala 35 proteinů. Počet palmitoylovaných proteinů u *Saccharomyces cerevisiae* se tak díky této studii zčtyřnásobil. Mezi nově objevené palmitoylované proteiny se řadily SNARE proteiny, tři G proteiny (Rho 2, Rho3 a Gpa2), manosyltransferázy, permeázy aminokyselin a další proteiny, které jsou součástí buněčné signalizace.

O 4 roky později, v roce 2008, byla publikována studie, ve které byla použita stejná kombinace metodik k analyzování palmitoylovaných proteinů a to konkrétně u kultivovaných embryonálních kortikálních neuronů a purifikovaných synaptosomálních frakcí u myši (Kang et al., 2008). Výsledkem této studie byla charakterizace 68 palmitoylovaných proteinů, které do té doby byly známy, a dalších 200 zcela nových palmitoylovaných proteinů, které v té době autoři označili za kandidáty na palmitoylované proteiny. U náhodného testování 21 z těchto proteinů byla již palmitoylace potvrzena v době, kdy publikace vyšla. Mezi nově identifikované palmitoylované proteiny se řadily receptory pro neurotransmitery, adhezivní

molekuly, SNARE proteiny, transportéry, podjednotky receptoru NMDA a velké množství proteinů, které se účastní intracelulárního vezikulárního transportu.

V následujících letech několik vědeckých skupin zpracovalo obdobným způsobem data z rozličných buněk či tkání, například u *Trypanosomy brucei* (Emmer et al., 2011), lidských B lymfocytů (Ivaldi et al., 2012, p. 2), *Plasmodia falciparum* (Jones et al., 2012) a mnoha dalších a "palmitoylom" (soubor všech proteinů, které jsou palmitoylovány) se s každou publikací jen rozrůstal.

Díky analýze palmitoylomů několika organismů, lidských či myších buněk (nebo tkání) se nakonec ukázalo, že palmitoylace je jev mnohem rozšířenější, než se dříve předpokládalo. Na počátku výzkumu palmitoylovaných proteinů se ukázalo, že palmitoylovány jsou proteiny v cytoplazmatické membráně či na začátku sekretorické dráhy - v membráně Golgiho aparátu či endoplazmatického retikula. Později se však zjistilo, že palmitoylována je také řada proteinů, které se nacházejí i v membránách jiných buněčných organel a to konkrétně například v membráně mitochondrií (Kostiuk et al., 2008), specifického endocytického vaku (Kanaani et al., 2004) či synaptických váček (Prescott et al., 2009).

V současnosti se předpokládá, že palmitoylom lidských buněk čítá okolo 500-1000 proteinů (Resh, 2017). Dá se předpokládat, že toto číslo se bude v budoucích letech jen zvyšovat a je velmi pravděpodobné, že dosáhne hodnoty několika tisíc.

1.1. Cíle práce

Účelem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o palmitoylaci proteinů v eukaryotických a prokaryotických buňkách. V první části práce popisují mechanismus, kterým palmitoylace probíhá a soustředím se blíže na proteinovou doménu DHHC, která byla identifikována před 20ti lety a svou enzymatickou aktivitou sehraje zásadní roli v procesu palmitoylace. Ve své práci se zabývám vlivem palmitoylace na biologické funkce proteinů a popisem buněčných mechanismů, ve kterých má palmitoylace nezastupitelnou roli jakožto důležitý regulátor.

2. Palmitoylace

2.1. Lipidické post-translační modifikace

Proteiny, které dokončí translaci na ribozomech drsného endoplazmatického retikula, mohou být následně post-translačně upraveny. Post-translační modifikace probíhají na postranních řetězcích aminokyselin nebo na C- či N-konci samotného proteinu. Post-translační modifikace zásadním způsobem ovlivňují vlastnosti proteinů a předurčují jejich následnou lokalizaci a funkci v buňce. Mezi časté post-translační modifikace se řadí fosforylace, glykosylace a v neposlední řadě právě lipidické modifikace.

Lipidů, které jsou kovalentně vázány na proteiny, je celá řada. Nejčastější společnou vlastností proteinů, které jsou post-translačně modifikovány pomocí lipidů, je jejich velká afinita k membránám a následná interakce s nimi. Mezi lipidy, které proteiny post-translačně či ko-translačně modifikují, se řadí například kyselina oktanová, kyselina stearová, farnesylová skupina, kyselina myristová, cholesterol a v neposlední řadě pak kyselina palmitová. Z těchto lipidických modifikací jsou nejběžnější (a také nejlépe prozkoumané) myristoylace, S-prenylace a poté S-palmitoylace nebo S-acylace.

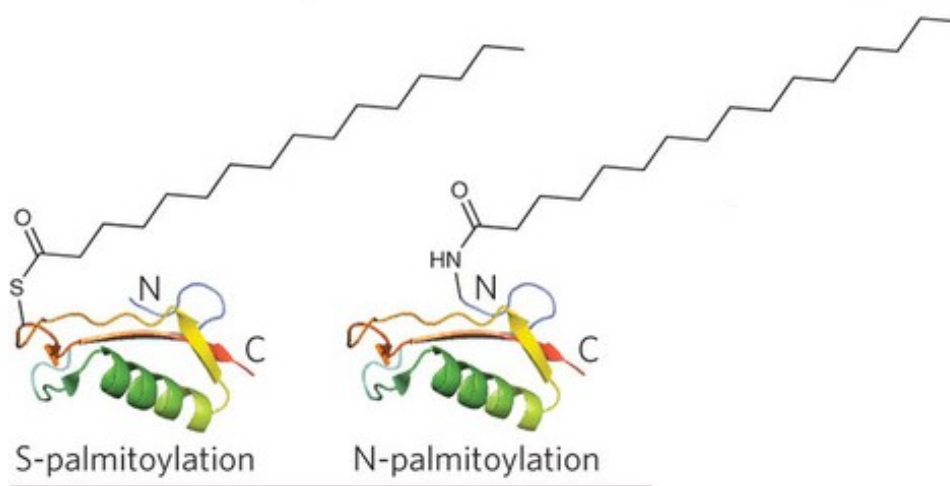
Myristoylace je modifikace proteinů pomocí zbytku nasycené mastné kyseliny myristové o délce čtrnácti uhlíků. Tato modifikace je svým charakterem blízká S-palmitoylaci. Myristoylace může probíhat post-translačně či ko-translačně a hraje zásadní roli v signálních kaskádách, sekreci proteinů či apoptóze (Farazi et al., 2001). U myristoylace byla již detailně popsána její enzymologie. N-myristoyltransferáza rozpoznává přibližně 10 aminokyselin v okolí N-konce proteinu a katalyzuje přenos zbytku kyseliny myristové na N-koncový glycin (Resh, 1999).

Prenylace je kovalentní navázání farnesylové či geranylgeranylové skupiny (Casey and Seabra, 1996). Jedná se o další lipidickou modifikaci proteinů, u které byl identifikován specifický motiv aminokyselinové sekvence. U S-prenylace probíhá modifikace na cysteinu v blízkosti C-konce proteinu s motivem CaaX (Maurer-Stroh and Eisenhaber, 2005; C= cystein, a = alifatická aminokyselina, X libovolná aminokyselina).

Jednotlivá lipidická modifikace se u proteinů může vyskytovat i v kombinaci s jinou lipidickou modifikací. Popsána byla kombinace palmitoylace s myristoylací, poté farnesylace s palmitoylací či palmitoylace s navázáním cholesterolu (Resh, 2013). Lipidická modifikace, která probíhá jako první, zpravidla slouží jako spouštěcí signál pro následující lipidickou modifikaci.

2.2. Palmitoylace a její průběh

Palmitoylace je kovalentní post-translační lipidická modifikace, u které dochází k navázání zbytku nasycené mastné kyseliny palmitové o délce šestnácti uhlíků na specifický cystein. Pokud palmitoylace probíhá na cysteinu umístěném na N-konci proteinu a zbytek kyseliny palmitové se váže přes stabilní amidovou vazbu, jedná se o tzv. N-palmitoylaci (viz obrázek č. 1). Pokud však palmitoylace probíhá na C-konci proteinu či uvnitř proteinu a zbytek kyseliny palmitové se váže přes labilní thioesterovou vazbu, jedná se o tzv. S-palmitoylaci (viz obrázek č. 1). N-palmitoylace byla objevena například u významného signálního proteinu nazývaného sonic hedgehog (Pepinsky et al., 1998). Nicméně S-palmitoylace se oproti N-palmitoylaci vyskytuje mnohem častěji. Tato práce se soustředí především na S-palmitoylaci, proto budu v textu nadále užívat slova palmitoylace ve smyslu S-palmitoylace.



Obrázek č. 1: Porovnání S-palmitoylace (navázání palmitátu přes thioesterovou vazbu) a N-palmitoylace (navázání palmitátu přes amidovou vazbu). Převzato z (Hannoush and Sun, 2010).

Palmitoylace se od ostatních lipidických post-translačních modifikací, které byly blíže prozkoumány (myristoylace a prenylace) liší především třemi unikátními vlastnostmi. Tou první je její reverzibilita (Magee et al., 1987). Palmitoylace je jedinou lipidickou post-translační modifikací, která je reverzibilní. Díky reverzibilitě je možné palmitoylaci regulovat v palmitoylačních/depalmitoylačních cyklech a to obdobným způsobem, jakým je regulována fosforylace, ubikvitinace či acetylace. Sama palmitoylace reguluje velice dynamickým

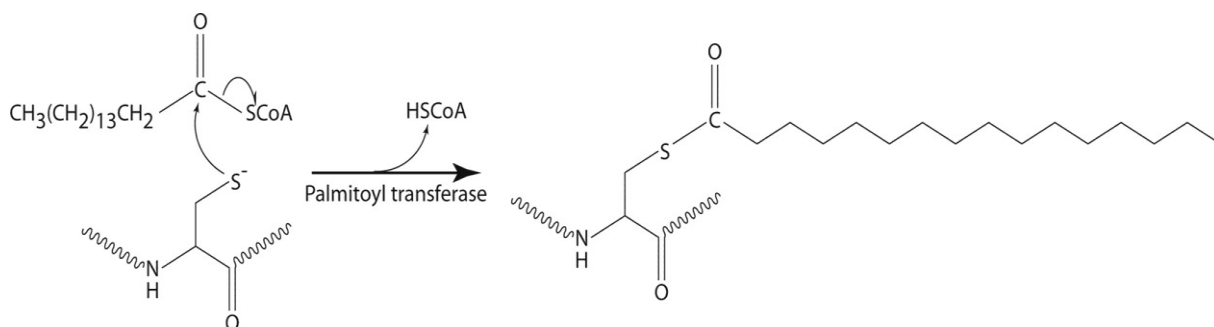
způsobem lokalizaci a stabilitu mnoha proteinů. Druhou unikátní vlastností palmitoylace je absence typické aminokyselinové sekvence v okolí cysteinových zbytků, na kterých palmitoylace probíhá (Resh, 2004). Přestože nebyla zjištěna typická aminokyselinová sekvence obklopující cysteinové zbytky (Roth et al., 2006), analýza stovek transmembránových palmitoylovaných proteinů dala vznik webovým algoritmům, které slouží k predikci palmitoylovaných sekvencí v daném transmembránovém proteinu (<http://csspalm.biocuckoo.org>; <http://bioinfo.ncu.edu.cn/WAP-Palm.aspx>). Analýza sekvencí transmembránových proteinů dala také vznik studii, která navrhla motiv TMDX₁₋₁₂aaC(C)a (TMD = transmembránová doména, a = alifatická aminokyselina, X = libovolná aminokyselina, C = cystein) jako konzervovaný motiv pro palmitoylované proteiny u viru Vaccinia (Grosenbach et al., 1997). Tento navržený motiv se však vztahuje pouze na velmi úzkou skupinu palmitoylovaných proteinů.

Třetí unikátní vlastností palmitoylace je možnost vzájemného ovlivnění dalšími post-translačními lipidickými modifikacemi. Protein, který je palmitoylován, bývá často modifikován i jiným lipidem. Tato lipidická modifikace zpravidla palmitoylaci předchází, neboť sama o sobě není reverzibilní.

Cysteinové zbytky, na kterých dochází k palmitoylaci, vykazují několik společných charakteristik (Salaun et al., 2010). Mezi tyto charakteristiky patří v první řadě fakt, že cysteiny jsou většinou přilehlé k sekvenci, kde dochází k myristoylaci či prenylaci. Dále platí, že okolní aminokyseliny cysteinu mají hydrofobní charakter. A nakonec je tu skutečnost, že palmitoylované cysteiny membránových proteinů se často vyskytují v cytosolické části proteinu, která přiléhá k transmembránovému segmentu, nebo se nacházejí přímo v transmembránovém segmentu (Resh, 2004).

Palmitoylované proteiny lze pak rozřadit do čtyř kategorií. V první kategorii jsou membránové receptory a jiné membránové proteiny, které jsou palmitoylovány na specifických cysteinech umístěných přímo v transmembránovém segmentu nebo na cysteinu přilehlém k tomuto segmentu. Do druhé kategorie se řadí palmitoylované proteiny, které jsou nejprve farnesylovány na C-konci v oblasti sekvenčního motivu CaaX a následně palmitoylovány. Do této kategorie se řadí například proteiny ze skupiny Ras. Ve třetí kategorii jsou proteiny, které jsou palmitoylovány blízko C- nebo N-konce proteinu. A do poslední kategorie se řadí proteiny, které podstupují kromě palmitoylace ještě další lipidickou modifikaci, a to myristoylaci (Resh, 1999, 1996).

Samotná reakce, u které dochází k navázání zbytku kyseliny palmitové na specifický cystein, vypadá následovně. Dochází k nukleofilnímu ataku thiolátového iontu deprotonovaného cysteinu na thioesterovou vazbu palmitoyl koenzymu A. Vzniká nová thioesterová vazba a výsledkem reakce je přesunutí palmitátu na specifický cystein v cílovém proteinu (viz obrázek č. 2).



Obrázek č. 2: Palmitoylační reakční schéma, katalýza probíhá pomocí palmitoyl transferáz. Převzato z (Munday and López, 2007).

Palmitoylační reakce spadá do kategorie chemických reakcí, které jsou reverzibilní a katalyzované. Identifikace palmitoylačních enzymů však trvala mnoho let a spekulovalo se o tom, zda-li jsou palmitoylační enzymy v této reakci potřebné. K této myšlence vedlo především zjištění, že několik palmitoylovaných proteinů může být palmitoylováno i v nepřítomnosti katalytických enzymů, a to na stejných specifických cysteinech. Cysteiny jsou v tomto případě palmitoylovány pomocí volného palmitoyl koenzymu A, který je přítomný v cytosolu. Příkladem proteinu, u kterého byla nekatalyzovaná palmitoylace objevena, je α podjednotka G proteinu (Duncan and Gilman, 1996). Pro nekatalyzovanou palmitoylaci α podjednotky G proteinu *in vitro* byly zjištěny obdobné podmínky jako pro palmitoylaci této podjednotky *in vivo*.

Za fyziologických podmínek se však palmitoyl koenzym A v buňkách vyskytuje pouze v nanomolárních koncentracích, které až na výjimky nejsou pro nekatalyzovanou palmitoylaci proteinů dostačující. Ve valné většině případů je palmitoylace a i depalmitoylace procesem enzymatickým. Palmitoylaci proteinů katalyzují palmitoyltransferázy a následná depalmitoylace je katalyzována thioesterázami. Těmto enzymům se budu věnovat v následující kapitole.

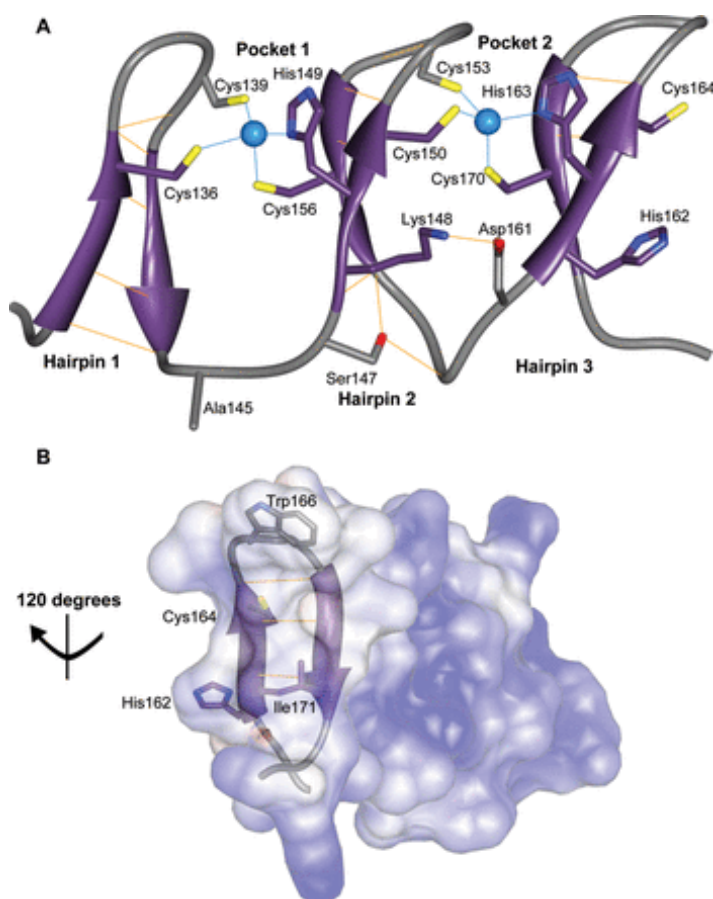
3. Enzymy regulující palmitoylaci/depalmitoylaci

3.1. Palmitoyltransferázy

Určit enzymy, které proteiny palmitoylují, bylo po dlouhou dobu složité, a to z několika důvodů. Hlavním důvodem byl fakt, že tyto enzymy jsou vázané k membráně a jejich purifikace je velice nesnadná. Enzymy, které katalyzují palmitoylaci, se nazývají palmitoyltransferázy. Součástí palmitoyltransferáz je DHHC proteinová doména (Putilina et al., 1999), která je zodpovědná za enzymatickou aktivitu a byla pojmenována dle konzervovaného sekvenčního motivu aminokyselin (Asp-His-His-Cys).

Prvními identifikovanými geny, které hrají důležitou roli v enzymologii palmitoylace, byly geny Erf2 (Bartels et al., 1999) a Erf4 (Jung et al., 1995) (Jung et al., 1995, p. 5) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Erf2 a Erf4 jsou podjednotky acyltransferázy proteinu Ras (Ras PAT), která může palmitoylovat protein Ras (Putilina et al., 1999). Podjednotka Erf4 sama nedisponuje palmitoyltransferázovou aktivitou, nicméně její přítomnost je v tomto komplexu nezbytná. Mezi funkce Erf4 se řadí stabilizace podjednotky Erf2 a také stabilizace intermediátu palmitoyl-Erf2 v prvním kroku přenosu palmitátu na daný protein (Mitchell et al., 2012). Pokud není Erf4 přítomna, dochází k degradaci Erf2 prostřednictvím dráhy ERAD. Nicméně stabilizace podjednotky Erf2 v nepřítomnosti Erf4 neobnoví palmitoyltransferázovou aktivitu Erf2 a podjednotka Erf4 tak pravděpodobně disponuje ještě jinými funkcemi.

Erf2 kóduje membránový integrální protein o velikosti 41kDa, jehož součástí jsou čtyři transmembránové úseky. Tyto transmembránové úseky mají společnou konzervovanou doménu bohatou na cystein označovanou DHHC-CRD ("DHHC-cysteine rich domain"). Samotná DHHC-CRD doména má v oblasti Cys4 (v jejím katalytickém místě) prostorovou konfiguraci podobnou motivu zinkového prstu C2H2. Dříve se předpokládalo, že existují acetyltransferázy (PAT), které nedisponují CRD (Mitchell et al., 2006) a ani nemohou vázat atom zinku (Akr1, Akr2 a Pfa5 u *Saccharomyces cerevisiae*). V roce 2013 však byla publikována studie, která předpokládá přítomnost DHHC-CRD u všech PAT (Montoro et al., 2013). V této studii mimoto ukázali, a to u PAT Swf1 *Saccharomyces cerevisiae*, že DHHC-CRD je schopna vázat atom zinku (Montoro et al., 2013), a zároveň predikovali 3D strukturu DHHC-CRD u Swf1 (obrázek č. 3) pomocí homologního modelování ("homology modelling").



Obrázek č. 3: A) Stuhový diagram predikované 3D struktury Swf1 DHHC-CRD u *Saccharomyces cerevisiae*. B) Zobrazení predikovaného povrchu pro strukturu Swf1 DHHC-CRD. Převzato z (Montoro et al., 2013, p.).

Další palmitoyltransferázou, která byla identifikována u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pomocí fenotypické analýzy, byl protein obsahující ankyrinovou repetici Akr1 (Feng and Davis, 2000, p. 1) (ankyrin-repeat-containing protein). Tato palmitoyltransferáza katalyzuje palmitoylaci dvou kaseinových kináz: Yck1p (yeast casein kinase 1) a Yck2p (yeast casein kinase 2). Palmitoylace u Yck1p a Yck2p zajišťuje jejich lokalizaci na cytoplazmatické membráně.

Celkově bylo zatím u kvasinek identifikováno 7 DHHC proteinů (Roth et al., 2006), zatímco v savčích buňkách 22 DHHC proteinů a u lidí 23 DHHC proteinů (Fukata and Fukata, 2010). Momentálně je nejasné, z jakého důvodu exprimují buňky několik odlišných DHHC proteinů a jaká je jejich substrátová specifita (Varner et al., 2003). V posledních letech vyšlo najevo, že různé DHHC proteiny sice vykazují odlišnou substrátovou specifitu, ale jejich substrátová specifita se překrývá (Fukata et al., 2004).

DHHC proteiny se mezi sebou liší svou lokalizací - některé z nich se vyskytují v endoplazmatickém retikulu, některé v Golgiho aparátu a některé i v endocytických váčcích. V roce 2007 byly publikovány studie (Linder and Deschenes, 2007; Linder et al., 2007) charakterizující lokalizaci DHHC proteinů v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a v lidských embryonálních nefronech (HEK 293 buňky). U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byla většina DHHC proteinů lokalizována v endoplazmatickém retikulu či v Golgiho aparátu, menší část DHHC proteinů byla umístěna v cytoplazmatické membráně či ve vakuole. U kvasinky bylo sedm DHHC proteinů lokalizováno následovně: Swf1, Erf2 a Pfa4 v endoplazmatickém retikulu, Akr1 a Ak2 v Golgiho aparátu, Pfa5 v plazmatické membráně a Pfa3 ve vakuole. Později vyšlo najevo, že u určitého DHHC proteinu může jeho výsledná lokalizace záviset na tom, v jaké buňce se nachází. Takovým příkladem je protein DHHC 8 (He et al., 2014), který se v lidských epiteliálních buňkách nachází v cytoplazmatické membráně a naproti tomu v HEK buňkách je lokalizován v membráně Golgiho aparátu.

DHHC proteiny jsou membránové proteiny, které nejméně čtyřikrát procházejí lipidovou dvojvrstvou dané membrány. Katalytické místo DHHC proteinů se obvykle nachází na cytosolické straně těchto proteinů a zpravidla katalyzuje přenos palmitátu na cytosolickou část daného proteinu ukotveného v membráně. DHHC proteiny se mezi sebou poměrně výrazně liší sekvencí cytosolických domén, které se nachází na N- či C- konci, a tato variabilita umožňuje DHHC proteinům různé specifické interakce protein-protein. Příkladem jsou proteiny DHHC13 a DHHC17 obsahující společnou ankyrinovou doménu (Lemonidis et al., 2015), která má významnou funkci u interakcí protein-protein. Předpokládá se, že právě tato variabilita v jiných cytosolických doménách předurčuje lokalizaci a specifitu DHHC proteinů, jelikož se zatím zdá, že samotná DHHC doména specifitu neurčuje (Greaves et al., 2010).

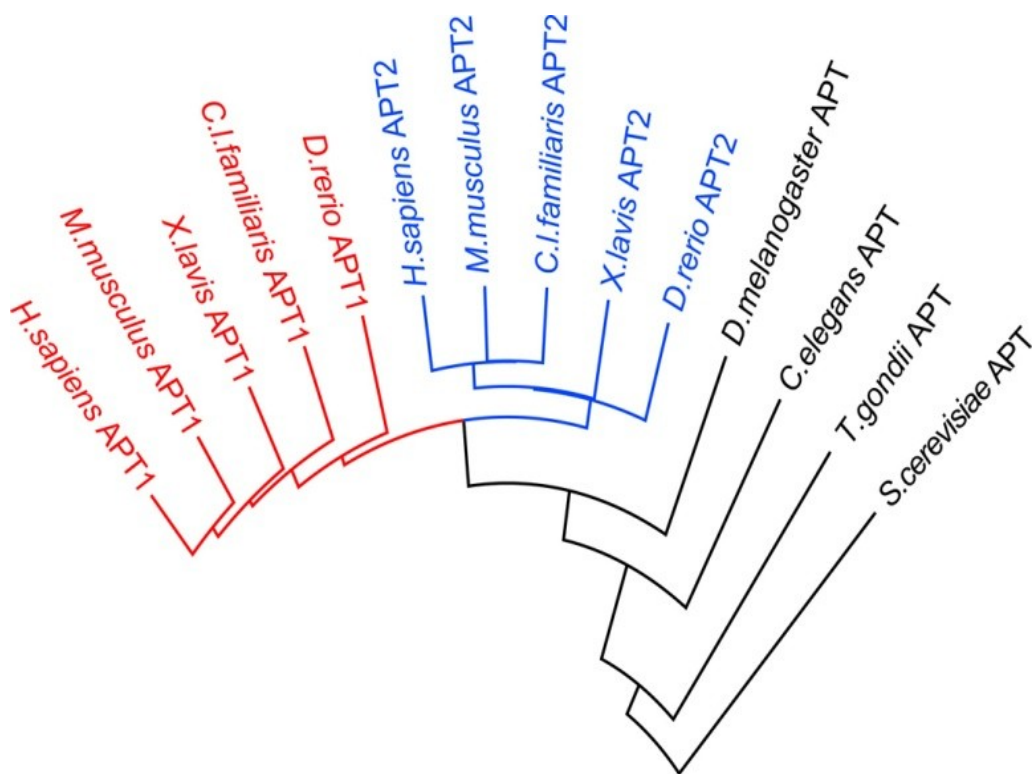
3.2. Thioesterázy

I samotný proces depalmitoylace je katalyzován enzymy. Tyto enzymy se obecně nazývají thioesterázy a čtyři z nich zatím byly identifikovány. První dvě se nazývají acyl-protein thioesteráza APT1 (Duncan and Gilman, 1998) a acyl-protein thioesteráza APT2 (sdílející 66% sekvenční identitu na aminokyselinové úrovni s APT1) - obě tyto acyl-protein thioesterázy jsou převážně lokalizovány v cytoplasmě. Zbylé dva enzymy se nazývají palmitoyl-protein thioesteráza 1 (PPT1; (Camp and Hofmann, 1993) a palmitoyl-protein thioesteráza 2 (PPT2; Soyombo and Hofmann, 1997) a nacházejí se v lysosomech (Verkruyse and Hofmann, 1996).

Ve srovnání s velkým množstvím informací, které jsou již známy o palmitoyltransferázách, se toho o thioesterázách ví stále poměrně málo. Prvně popsáným depalmitoylačním enzymem se stala APT1, která je v současnosti nejdetailněji prozkoumanou thioesterázou. Poprvé byla izolována ze supernatantu, který pocházel z krysích jater, a původně byla pojmenována jako lysofosfolipáza I (Sugimoto et al., 1996). O pár let později byl enzym přejmenován a zařazen do správné kategorie. Stalo se tak poté, co po provedené deleci genu (v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*) kódujícího APT1 nebyla detekována žádná thioesterázová aktivita (Duncan and Gilman, 1998). Delece v kvasinkovém homologu APT1 měla za následek snížení frekvence depalmitoylace u α podjednotky G proteinů (Duncan and Gilman, 1998). Kromě toho, že APT1 depalmitoyluje $G\alpha$ proteiny, hraje APT1 také zásadní roli v regulaci depalmitoylace endoteliální syntázy oxidu dusnatého (Yeh et al., 1999). APT1 také depalmitoyluje protein SNAP 23 (Zeidman et al., 2009), který sice spadá do rodiny SNARE proteinů, ale na rozdíl od ostatních proteinů této rodiny není produkován na nervových zakončeních. Protein SNAP 23 reguluje exocytózu v různých typech buněk a je naprosto nezbytný pro přirozené fungování buněk (Kaul et al., 2015).

Dalšími významnými proteiny, které APT1 depalmitoyluje, jsou proteiny ze skupiny Ras (Siegel et al., 2009). Tyto protoonkogeny depalmitoyluje i druhá acyl-protein thioesteráza APT2. Překvapivě, APT2 (z 68 % homologní k APT1) má dle kinetických studií semi-syntetickém proteinu N-ras dvakrát vyšší aktivitu než APT1 (Rusch et al., 2011). Zároveň APT1 i APT2 také depalmitoylují axonální protein GAP-43 (Tomatis et al., 2010) na cysteinových zbytcích, které jsou umístěny na pozicích 3 a 4. Dlouhou dobu nebylo zřejmé, jak enzymy (APT1 a APT2) umístěné v cytosolu mohou katalyzovat depalmitoylacii proteinu GAP-43 a proteinů Ras, které jsou zakotvené v membráně. Nakonec bylo zjištěno, že samy acyl-protein thioesterázy APT1 a APT2 potřebují být palmitoylovány a to na cysteinovém

zbytku na pozici 2 (Kong et al., 2013). Až poté, co tato reakce proběhne, mohou interagovat s proteiny, které jsou v membráně zakotvené, a následně je mohou depalmitoylovat. Fylogenetické studie zkoumající množství acyl-protein thioesteráz napříč organismy ukázaly, že u bezobratlých živočichů se vyvinul jen jeden typ acyl-protein thioesterázy APT, zatímco u obratlovců se vyvinuly dva - APT1 a APT2 (viz obrázek č. 4).



Obrázek č. 4: Fylogenetický strom zobrazující acyl-protein thioesterázy u bezobratlých živočichů a u obratlovců. Převzato z (Davda and Martin, 2014).

PPT1 je další významnou thioesterázou. Mutace v genu pro PPT1 vede k neléčitelnému neurodegenerativnímu onemocnění a k infantilní formě neurální ceroidní lipofuscinózy (Vesa et al., 1995). V posledních letech vzniklo několik nových terapeutických přístupů, které jsou zaměřené na léčbu tohoto onemocnění pomocí nahrazení enzymu PPT1.

Sama PPT1 je palmitoylována a to prostřednictvím DHHC3 a DHHC7 (Segal-Salto et al., 2016). Palmitoylace PPT1 je nezbytná především z důvodu, aby se z lysozomu přemístila směrem k cytoplazmatické membráně a zde mohla depalmitoylovat proteiny, které jsou součástí palmitoylačních/depalmitoylačních cyklů a které asociují se synaptickými váčky. PPT1 se za fyziologických podmínek vyskytuje i v presynaptických kompartmentech (synaptosomech a synaptických váčkách) a je v této oblasti naprosto nepostradatelná pro

recyklaci palmitoylovaných proteinů (Kim et al., 2008). Kromě toho byla zjištěna důležitá role PPT1 u apoptózy. Pacienti trpící neuronální ceroidní lipofuscinózou vykazují částečnou rezistenci k buněčné smrti, která je indukovaná tumor nekrotizujícím faktorem ("TNF-induced cell death").

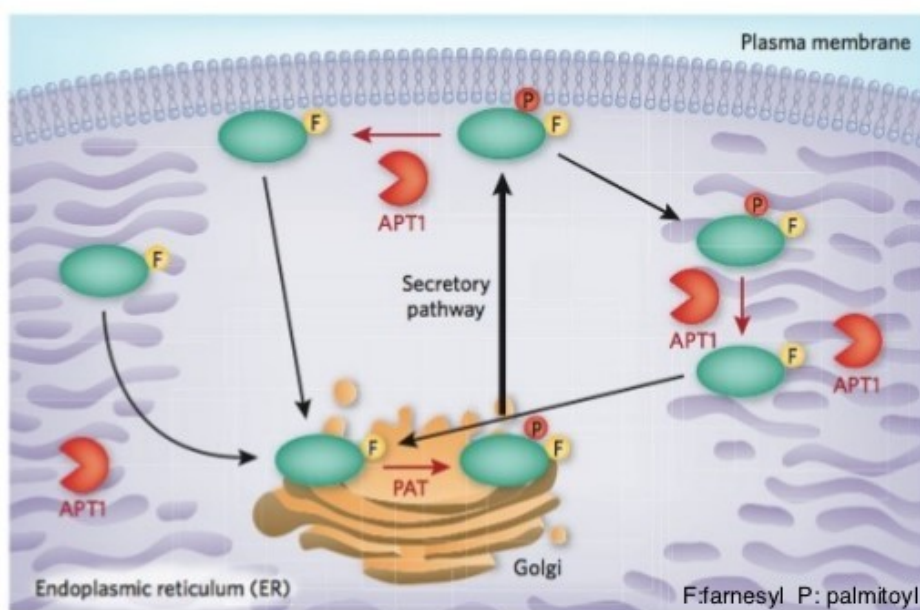
O poslední palmitoyl protein thioesteráze-2 (PPT2) je známo podstatně méně informací oproti jejímu homologu PPT1. PPT2 je silně exprimována v Purkyňových buňkách mozečku, v thalamu a v hypokampu. Tato thioesteráza sdílí pouze 18% sekvenční identitu na aminokyselinové úrovni s PPT1. U PPT2 bylo společně s její identifikací zjištěno, že její thioesterázová aktivita je svou efektivitou podobná té, jakou má PPT1. PPT2 se však od PPT1 odlišuje ve své substrátové specifitě a není schopná depalmitoylovat proteiny, které PPT1 depalmitoyluje (Soyombo and Hofmann, 1997, p. 2). Poté, co byla vyřešena krystalová struktura PPT1 a PPT2 (Calero et al., 2003), objasnil se důvod této odlišnosti. Ukázalo se, že malé rozdíly v prostorové struktuře těchto dvou enzymů jsou zásadní pro interakci se substráty. Hlavním rozdílem je v případě PPT2 omezený prostor mezi dvěma β -skládanými listy ($\beta 3$ - αA and $\beta 8$ - αF) nad žlábkem vázajícím lipid ("lipid-binding groove"), do kterého by se měl navázat palmitoylovaný protein. Tato prostorová charakteristika PPT2 předurčuje možnost hydrolyzovat pouze nerozvětvené struktury (jako je například palmitoyl-CoA), ale zároveň není schopna hydrolyzovat palmitoylcystein či obecně palmitoylované proteiny.

4. Vliv palmitoylace na biologické funkce proteinů

4.1. Vliv palmitoylačních/depalmitoylačních cyklů na biologické funkce proteinů

Ukázalo se, že pro dynamiku mnoha dějů, které probíhají v buňkách, je velice významná souhra mezi palmitoylací a depalmitoylací. Vzhledem k tomu, že palmitoylace je reverzibilní post-translační modifikace, mohou se díky této modifikaci některé proteiny dynamicky přesouvat mezi jednotlivými intracelulárními kompartmenty. Palmitoylace tímto způsobem efektivně reguluje funkce daného proteinu.

Jako příklad takových proteinů uvedu proteiny ze skupiny Ras (H-Ras a N-Ras), které se v savcích buňkách dynamicky přesouvají mezi plazmatickou membránou a membránou Golgiho aparátu (Rocks et al., 2005). Hnací silou pro tento neustálý cyklický pohyb je pro ně právě palmitoylace či depalmitoylace. Palmitoylace u Ras proteinů probíhá v Golgiho aparátu, odkud daný Ras protein putuje pomocí vezikulárního transportu směrem k cytoplazmatické membráně a následně s ní asociuje (viz obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Schématické znázornění palmitoylačního/depalmitoylačního cyklu u proteinů ze skupiny Ras. Převzato z (Cox, 2010).

Depalmitoylace je potom signálem k uvolnění proteinu do cytosolu, odkud je přenesen vezikulárním transportem zpět do Golgiho aparátu. Tím je umožněna jeho opětovná

palmitoylace a protein tak může vstoupit do dalšího cyklu. Předpokládá se, že hlavním důvodem tohoto kontinuálního cyklu je zabránit Ras proteinům interagovat s membránami jiných buněčných kompartmentů. Experimentálně bylo u H-Ras proteinu zjištěno, že pokud se v buňkách inhibuje APT1 pomocí palmostatinu B, dochází k chaotickému pohybu H-Ras proteinu mezi vnitřními membránami (Dekker et al., 2010).

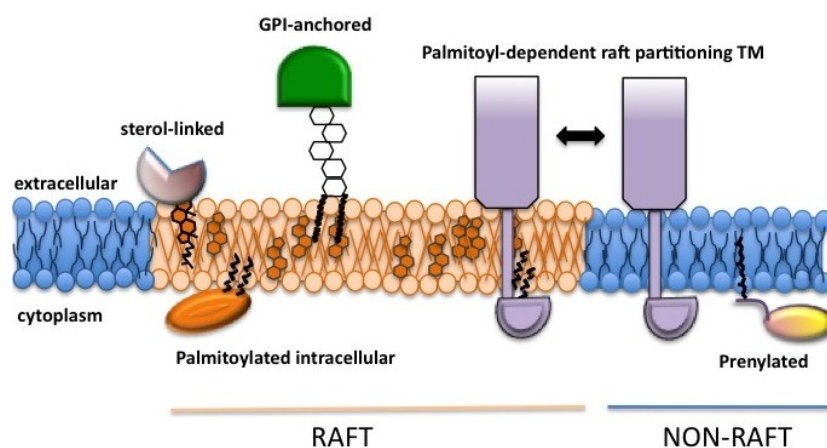
Obdobně dynamickým palmitoylačním/depalmitoylačním cyklem prochází také α podjednotka G proteinu (Wedegaertner and Bourne, 1994). Tato podjednotka G proteinů se přesouvá (stejně jako proteiny ze skupiny Ras) mezi plasmatickou membránou a Golgiho aparátem. Jak proteiny ze skupiny Ras, tak α podjednotka G proteinu prochází v tomto dynamickém cyklu ještě jednou post-translační modifikací. Tato post-translační modifikace v obou případech předchází palmitoylaci a je narozdíl od palmitoylace statická a ireverzibilní. U α podjednotky G proteinu je touto statickou modifikací myristoylace, u proteinů ze skupiny Ras je tou modifikací farnesylace. Tyto modifikace, které předcházejí palmitoylaci, umožňují danému proteinu snáze interagovat s cytoplasmatickou membránou.

Dalším proteinem, u kterého probíhá palmitoylační/depalmitoylační cyklus, je postsynaptický densitní protein 95 (PSD-95). PSD-95 je majoritní složkou v tzv. postsynaptické denzitě, což je hustá bílkovinná struktura skládající se z několika stovek různých proteinů a signálních molekul, které pomáhají regulovat intenzitu výsledného synaptického přenosu (Kennedy, 2000). PSD-95 je nejenom nejvíce zastoupeným proteinem v postsynaptické denzitě, ale také se shlukuje o něco dříve než ostatní proteiny a zároveň leží blíže postsynaptické membráně než ostatní bílkoviny. Palmitoylace v blízkosti N-konce proteinu PSD-95 je zásadní post-translační modifikací, která předurčuje jeho následnou lokalizaci v postsynaptickém prostoru (Topinka and Bredt, 1998, p.). Dlouhou dobu bylo zcela nejasné, jakými molekulárními mechanismy tento cyklus probíhá. Poté byly objeveny nanodomény (Fukata et al., 2013), které se skládají ze shluků palmitoylovaných proteinů PSD-95. Jednotlivé palmitoylované proteiny PSD-95 zde představují funkční jednotky celé nanodomény. Proteiny PSD-95 v nanodoménách prochází jednotlivými palmitoylačními/depalmitoylačními cykly, palmitoylační aktivita zde zajišťuje rozčlenění shluků proteinu PSD-95 do pomyslných trnů. Poté bylo objasněno (Fukata et al., 2004, p. 95), jakým způsobem jsou cykly u proteinu PSD-95 regulovány. Ukázalo se, že depalmitoylaci u proteinu PSD-95 regulují serinové hydrolázy, které jsou zakotvené v cytoplasmatické membráně. Z těchto serinových hydroláz byly zatím tři identifikovány - abhydrolázová doména obsahující 17A ABHD17A ("abhydrolase domain containing 17A"), ABHD17B a ABHD17C.

4.2. Vliv palmitoylace na interakce s lipidovými rafty

V roce 1972 byla publikována studie membrán, která popsala model fluidní mozaiky (Singer and Nicolson, 1972). Tento model charakterizoval novým způsobem strukturu cytoplazmatické membrány. Model popisoval membránu jako nepohyblivou dvojitou vrstvu fosfolipidů, ve které se náhodně pohybují proteiny. O dva roky později byly v rámci studie zaměřené na vliv teploty na cytoplazmatickou membránu objeveny klastry lipidů ("clusters of lipid"; Lee et al., 1974). A poté byla v roce 1982 zveřejněna studie, která upřesnila, jak jsou lipidy v cytoplazmatické membráně uspořádány (Karnovsky et al., 1982). Tato studie popsala, že lipidy jsou zde uspořádány do tzv. lipidových domén ("lipid domains"), v dnešní době spíše známé pod pojmem lipidové rafty.

Lipidové rafty jsou organizované úseky v cytoplazmatické membráně, které jsou velice bohaté na cholesterol a glykosfingolipidy (viz obrázek č. 6). Lipidové rafty jsou více organizované než lipidová dvojvrstva, která je obklopuje a ve které se mohou volně pohybovat. Lipidové rafty slouží jako organizační centra pro spoustu signálních kaskád (významné jsou především u odpovědi imunitního systému), zároveň ovlivňují membránovou fluiditu a také jiné buněčné procesy jako je například neurotransmise (Simons and Toomre, 2000).



Obrázek č. 6: Schématické znázornění části cytoplazmatické membrány - části s lipidovým raftem a části bez lipidového raftu. Převzato z webové adresy <http://www.levental-lab.com/research.html>

Lipidické post-translační modifikace se v mnoha případech ukázaly jako zásadní pro nasměrování proteinů do lipidových raftů (Melkonian et al., 1999; Moffett et al., 2000). Mezi

tyto lipidické modifikace se řadí myristoylace, modifikace pomocí GPI-kotvy a také palmitoylace.

Jako první příklad palmitoylovaného proteinu, který významně figuruje v interakcích lipidových raftů, uvedu protein LAT ("linker for activation of T cells"). LAT je důležitý pro aktivaci T buněk. Celý proces aktivace T lymfocytů probíhá poté, co dojde ke kontaktu antigen prezentující buňky a daného T lymfocytu. Následně je potřeba, aby tato událost byla přeměněna na signál (zahrnující aktivaci signálních kaskád), který povede k úspěšné imunitní odpovědi. Protein LAT je integrální membránový adaptorový protein, který je fosforylován tyrosinkinázou krátce poté, co dojde k iniciaci aktivace T lymfocytů. Tato fosforylace vede následně k přímé či nepřímé interakci proteinu LAT s dalšími složkami této signální kaskády (například p85 podjednotka PI-3 kinázy, Grb2 protein, vav protein), které jsou nezbytné pro standardní průběh aktivace T lymfocytů. Palmitoylace LAT proteinu je nezbytná pro jeho nasměrování na cytoplazmatickou membránu do oblasti lipidového raftu a pokud je tento krok vynechán, protein LAT je jen velice slabě fosforylován (Zhang et al., 1998).

Jako další příklad uvedu povrchový glykoprotein CD44. Antigen CD44 zastává na buněčném povrchu spoustu funkcí. Jednak je CD44 primárním buněčným receptorem pro kyselinu hyaluronovou (jednu z hlavních makromolekul v extracelulární matrix), zároveň také hraje významnou roli v buněčné proliferaci, diferenciaci, organizaci cytoskeletu, angiogenezi a v neposlední řadě v buněčné migraci. CD44 je palmitoylován na dvou cysteinových zbytcích a to na pozicích 286 a 295. Palmitoylace CD44 předurčuje jeho vysokou afinitu k lipidovým raftům, kde CD44 setrvává. Ukázalo se, že u migrujících nádorových buněk rakoviny prsu dochází k odpojení glykoproteinu CD44 od svého místa v lipidových raftech a jeho následné interakci s ERM proteiny, které jsou lokalizovány také na cytoplazmatické membráně (Donatello et al., 2012). Navíc se zjistilo, že mutace v Cys 286 a 295 v CD44 vede ke snížení migrace nádorových buněk rakoviny prsu. Zdá se, že taková regulace by se mohla stát novým terapeutickým cílem v léčbě rakoviny prsu (Babina et al., 2014).

Přestože byla existence lipidových raftů zpočátku opakovaně zpochybňována (Mukai et al., 2004), zdokonalování mikroskopických technik umožnilo o něco podrobnější zkoumání struktury cytoplazmatické membrány i lipidových raftů. Palmitoylace má v nasměrování proteinů do oblasti lipidových raftů nezastupitelnou roli.

5. Metody využívané pro detekci palmitoylace

5.1. ABE metoda

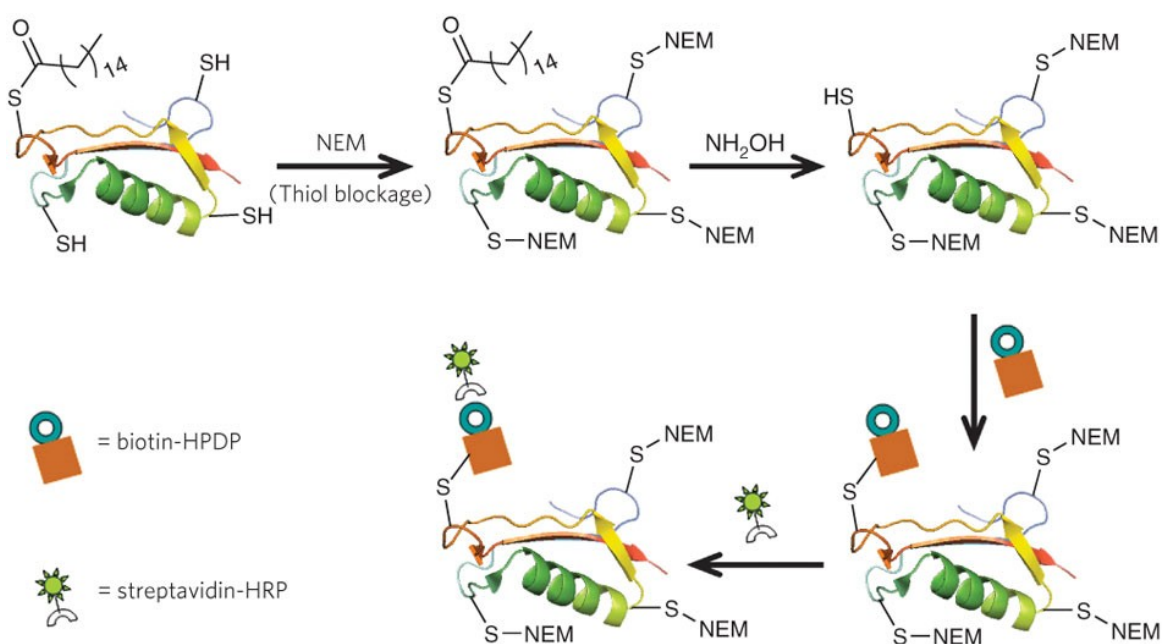
Po dlouhou dobu bylo možné palmitoylaci detekovat pouze pomocí metody nazývané metabolické značení ("metabolic labelling") palmitátu. V tomto případě byl palmitát radioaktivně označen, a to zpravidla tritiem ^3H . Takto radioaktivně značený palmitát byl zařazen do metabolismu živé buňky a detekce takto označeného palmitátu probíhala několik následujících týdnů (případně měsíců). Tato metoda však neposkytovala spolehlivá kvantitativní data o rozsahu palmitoylace daného proteinu a také představovala bezpečnostní rizika vzhledem k tomu, že byla nutná manipulace s radioaktivním izotopem. Zároveň byla metoda metabolického značení palmitátu omezena na kultury živých buněk, které byly schopné převzít radioaktivně značený palmitát z média a zakomponovat ho do svého metabolismu.

Vývoj ABE metody v roce 2004 byl pro studium palmitoylovaných proteinů naprosto zásadní (Vesa et al., 1995). Tato metoda umožnila oproti metodě metabolického značení palmitátu několikanásobně citlivější detekci palmitoylovaných proteinů. Drisdén a Green ve své publikaci uvedli, že u proteinu SNAP-25 je ABE metoda dokonce 12x citlivější oproti metabolickému značení a rovněž je časově i technicky méně náročná. Metoda ABE také umožňuje kvantitativní odhady celkové palmitoylace u daného proteinu a lze ji provádět *in vitro*.

Metoda ABE je založena na principu odstranění palmitátu z palmitoylovaných proteinů a následné navázání biotinu na volné cysteinové zbytky. Celý postup metody ABE se skládá z několika kroků (viz obrázek č. 7) a tyto kroky probíhají následovně. V kroku prvním jsou zablokovány volné cysteiny a to proto, aby nemohlo dojít k navázání biotinylové sloučeniny na volné thiolové skupiny. Tato blokace spočívá v alkylaci volných cysteinů a to zpravidla pomocí N-ethylmaleimidu (NEM). V druhém kroku je přidán hydroxylamin, který selektivně hydrolyzuje thioesterovou vazbu mezi palmitátem a daným cysteinem. Po uvolnění palmitátu zůstávají na proteinu volné thiolové skupiny. V následném kroku se na volné thiolové skupiny váže sloučenina obsahující biotin (bnt) - tento proces je nazýván biotinylace.

Pro biotinylacii je využíváno několik typů biotinylových sloučenin, které se specificky vážou na thiolové skupiny cysteinů. Mezi sloučeniny, které se často používají, se řadí bnt-BMCCC (1-biotinamido-4-[4'-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxamido] butan; Drisdén

and Green, 2004) nebo btn-HPDP (N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamid; Wan et al., 2007).



Obrázek č. 7 - Schéma postupů u metody ABE s použitím biotinu-HPDP. Převzato z (Hannoush and Sun, 2010).

Biotinylované proteiny jsou nakonec izolovány pomocí afinitní chromatografie. U afinitní chromatografie se k izolaci biotinylovaných proteinů používá agarózový nosič se streptavidinem s vysokou afinitou k biotinu. Nakonec jsou biotinylované proteiny identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie - technologie multi-dimensionální proteinové identifikace ("multi-dimensional protein identification technology", MuDPIT).

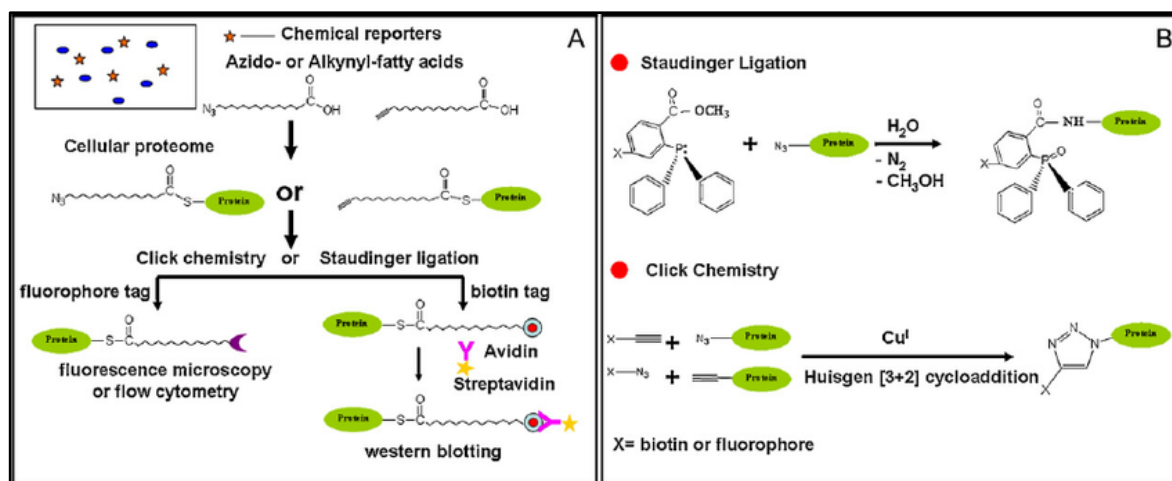
Důležitým krokem u metody ABE je ověření správných výsledků pomocí negativních kontrol daného vzorku. Ke vzorkům, které slouží jako negativní kontroly, se nepřidává hydroxylamin. U negativních kontrol by tak nemělo dojít k biotinylaci, jelikož zde nejsou k dispozici volné thiolové skupiny cysteinových zbytků.

Vývoj metody ABE byl naprosto stěžejní pro studium palmitoylovaných proteinů. V současnosti stále dochází k vylepšování dílčích kroků metody ABE - například je možné zkombinovat metodu ABE s imunoprecipitací (Brigidi and Bamji, 2013).

5.2. Metabolické značení analogem kyseliny palmitové následované klik chemií

Druhá metoda, která byla vyvinuta pro snadnější analýzu palmitoylovaných proteinů, se nazývá metabolické značení analogem kyseliny palmitové následované klik chemií ("metabolic labelling with a palmitic acid analog followed by click chemistry", tzv. MLCC). Název není příliš přesný, jelikož se namísto klik chemie často používá Staudingerova ligace.

V prvním kroku MLCC metody se k dané buněčné kultuře přidává analog kyseliny palmitové, kterým bývá buď alkynylový nebo azidový derivát kyseliny palmitové. Mezi analogy kyseliny palmitové, které se u MLCC používají, se také řadí například kyselina 14-tetradekanová, kyselina 17-oktadekanová (17-ODYA), kyselina 15-hexadekaoxoacetová (HDYOA) či kyselina 15-hexadekanová (15-HDYA). Jelikož jsou tyto analogy strukturně i funkčně velice podobné samotné kyselině palmitové, snadno se zakomponují do metabolické dráhy uvnitř buněk místo samotné kyseliny palmitové a pomocí endogenních palmitoyltransferáz se naváží na specifické cysteiny, na kterých je daný protein přirozeně palmitoylován.. V následujícím kroku se provede buněčná lýze a k buňkám se přidávají potřebné reagenty klik chemie či Staudingerovy ligace (viz. obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: A) Schématické zobrazení průběhu MLCC, po zakomponování analogů do metabolismu živých buněk se následně provádí reakce klik chemie či Staudingerova ligace. B) Schématické zobrazení Staudingerovy ligace a reakce klik chemie - Huisgenovy 3+2 cykloadice. Převzato z (Li et al., 2011).

První z možností je přidat k buněčnému lyzátu reagenty pro reakci klik chemie. Tato reakce je katalyzovaná CuI a je nazývána azido-alkynylová Huisgenova cykloadice (CuAAC).

Samotná reakce probíhá mezi azidem a alkynylem a produktem této reakce je 1,2,3- triazol, který zde vzniká z daného analogu kyseliny palmitové. Takto upravený analog může být analyzován pomocí fluorescence v gelu ("in-gel fluorescence") nebo mohou být buňky nejprve fixovány a poté pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Jinou možností úpravy proteinů je navázání biotinylové sloučeniny namísto fluoroforu, následná izolace proteinů pomocí afinitní purifikace a nakonec charakterizace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie.

Druhou možností je přidat k buněčnému lyzátu reagenty pro Staudingerovu ligaci. U Staudingerovy ligace dochází k reakci mezi daným analogem označeného proteinu a fosphinem a není u ní třeba přítomnost katalytického činidla. Daný fosphin může být biotinylován a může tak přenést biotin na daný protein nebo je protein biotinylován posléze. Následuje zachycení proteinu mechanismem afinitní purifikace na agarózovém nosiči se streptavidinem. Nakonec jsou biotinylované proteiny identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

MLCC bývá často různě modifikována. Například byla vyvinuta metoda pro měření palmitoylace hedgehog acyltransferázy nazvaná klik chemie spojená s ELISA (Lanyon-Hogg et al., 2015) .

Metoda využívající metabolického značení *in vivo* s využitím reakčního mechanismu klik chemie byla využita pro širokospektrální analýzu několika palmitoylomů. Například byla využita pro charakterizaci palmitoylomu savčích buněk (Martin and Cravatt, 2009).

Několik studií se věnovalo srovnávání metody ABE s MLCC a závěr byl takový, že obě metody identifikují velice podobný profil palmitoylovaných proteinů. Nejlepší možností se zdá být používání těchto dvou metod pro detekci palmitoylace současně. Tímto způsobem se profil palmitoylovaných proteinů doplní (Jones et al., 2012). Jisté je, že obě metody a modifikace těchto metod sehraávají v současnosti naprosto zásadní roli ve výzkumu palmitoylace a jejich vývoj umožnil identifikaci obrovského množství palmitoylovaných proteinů.

6. Patofyziologie palmitoylace

Shromážděním dat z 15ti proteomických studií zaměřených na palmitoylaci se ukázalo, že 1,838 genů kóduje proteiny, u kterých byla prokázána palmitoylace. Tento počet genů tak přibližně reprezentuje 10 % z celého lidského genomu a správná funkce proteinů kódovaných těmito geny je zásadní pro řadu fyziologických funkcí. Mezi nejčastější onemocnění, u kterých palmitoylace neprobíhá fyziologicky, se řadí například některé druhy rakoviny a poruchy nervového systému (Sanders et al., 2015).

V posledních letech rychle narůstá počet studií, které se zaměřují na roli DHHC proteinů v rakovinném bujení. Například protein DHHC2 svým působením připomíná funkci supresoru nádorů. Pokud je DHHC 2 overexprimován u hepatokarcinomu, dochází k inhibici proliferace, snížení migrace a také snížení invazivity daných rakovinných buněk (Peng et al., 2014). Kromě toho je exprese DHHC2 signifikantně snížena v metastatických ložiscích u kolorektálního karcinomu a také u karcinomu žaludku (Li et al., 2014). Jako další příklad uvedu proteiny DHHC7 a DHHC21, které palmitoylují receptory pro steroidní hormony estrogen, progesteron a androgeny. Tyto proteiny musejí být palmitoylovány, aby mohly být přeneseny na membránu, kde mají následně možnost aktivovat signální dráhu PI3K/AKT. Nadměrná aktivace této signální dráhy vede k inhibici apoptózy, zvýšené buněčné proliferaci a migraci a typicky je pozorována u rakovinných buněk (Pedram et al., 2012).

I jiné palmitoyltransferázy (například DHHC17, DHHC11, DHHC14 a mnoho dalších) mají důležitou roli v regulaci aktivity rakovinných buněk. V současnosti čím dál tím častější asociace DHHC proteinů s určitým typem rakoviny zvyšuje pravděpodobnost, že právě tyto enzymy by se mohly stát terapeutickým cílem u protirakovinné léčby.

Fyziologický průběh palmitoylace proteinů je také zásadní pro mozkovou činnost. Mezi neurologická onemocnění, která jsou přímo spjatá s nesprávným průběhem palmitoylace či depalmitoylace, se řadí například schizofrenie, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba či neuronální ceroidní lipofuscinóza (Vesa et al., 1995).

Typickým znakem Alzheimerovy choroby je hromadění amyloidu beta ($A\beta$) v mozkové tkáni, který vzniká štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Z nahromaděného $A\beta$ vznikají následně tzv. amyloidní plaky. Ukázalo se, že 10 % APP je palmitoylováno a to na pozicích Cys 186 a Cys 187. Overexprese palmitoyltransferáz, které jsou zodpovědné za tyto palmitoylace, vedla k dvojnásobné produkci $A\beta$. Naproti tomu inhibice těchto palmitoyltransferáz vedla k signifikantnímu snížení palmitoylace APP

(Bhattacharyya et al., 2013). Inhibice palmitoylace APP se tak zdá být možnou strategií pro prevenci či léčbu Alzheimerovy choroby.

Dalším příkladem je schizofrenie. Schizofrenie je duševní porucha, pro kterou je charakteristické abnormální sociální chování a selhávání myšlenkových procesů. Protein DHHC8 je palmitoyltransferáza, která byla u populace v Jižní Africe a v US přímo asociována se schizofrenií (Mukai et al., 2004). Asociace schizofrenie s proteinem DHHC8 byla také zjištěna u čínské populace Han. V několika jiných populacích však naopak nebyla zjištěna žádná asociace s proteinem DHHC8 a schizofrenií (Demily et al., 2007). Pro objasnění této nejasnosti bude třeba více porozumět molekulárním mechanismům schizofrenie.

Huntingtonova choroba (HD) je další onemocnění, u kterého má palmitoylace významnou roli. HD je podmíněna zmnožením tripletu CAG (Cyt-Ade-Gua) na konci genu, který kóduje protein huntingtin (htt). Funkce huntingtinu nebyla v lidském organismu zatím objasněna. Tento protein je palmitoylován na cysteinu 214 palmitoyltransferázou interagující s huntingtinovým proteinem 14 (Yanai et al., 2006). Htt je zároveň substrátem pro palmitoyltransferázu DHHC13. Obě tyto palmitoyltransferázy interagují s HTT. U mutantní formy HD jsou interakce mezi HTT a HIP14 a DHHC13 velice zeslabené, což vede ke snížené hladině palmitoylace HTT. Tato redukce palmitoylace u HTT vede ve výsledku k neuronální toxicitě. Nabízí se tedy možnost, že HD je onemocnění způsobené nedostatečnou palmitoylací huntingtinu (Sanders and Hayden, 2015).

Závěr

Velký význam vlivu palmitoylace na biologické funkce proteinů je nepopiratelný. V této práci jsem shrnula současné poznatky o palmitoylaci, od mechanismu průběhu této post-translační modifikace, přes charakteristiku DHHC proteinů, až po její patofyziologii.

S-palmitoylace je známá již několik desítek let. Za tuto dobu výzkum palmitoylace udělal velký krok vpřed, a to zejména díky vyvinutí metody ABE, která umožnila exponenciální nárůst počtu známých palmitoylovaných proteinů. Řada otázek v této oblasti bádání však stále zůstává nezodpovězena. Například u proteinů DHHC nebyla provedena žádná strukturní analýza pomocí NMR či rentgenové krystalografie a to především z důvodu složité topologie těchto proteinů. Zároveň je třeba více porozumět detailním mechanismům působení palmitoyltransferáz a thioesteráz. Možnost regulovat tyto palmitoylační/depalmitoylační enzymy v jejich cyklech by s sebou přinesla potenciální terapeutickou léčbu u řady onemocnění.

Seznam použitých zkratek

ABE metoda	metoda acyl biotinové výměny
ABHD17A, B, C	α/β hydrolase domain 17A,B,C
Akr1,2	ankyrin repeat-containing protein 1,2
APC	antigen prezentující buňka
Apt 1, 2	acyl protein thioesterase 1,2
DHHC	protein with aspartate-histidine-histidine-cysteine motif
DHHC-CRD	cysteine rich domain DHHC
ERAD	degradace spojená s endoplazmatickým retikulem
Erf 1,2	effect on Ras function 1,2
G proteiny	guanine nucleotide binding proteins
HEK buňky	human embryonic kidney cells
HTT	protein huntingtin
HD	Huntingtonova choroba
NMDA	kyselina N-methyl-D-asparagová
NMR	nukleární magnetická rezonance
PPT 1, 2	palmitoyl-protein thioesterase 1,2
PSD-95	postsynaptic density protein 95
SNARE protein	soluble NSF attachment protein
Swf1	spore wall formation
VSVG	vesikular stomatitis virus protein
Yck 1, 2 p	yeast casein kinase 1,2 p

Použitá literatura

- Babina, I.S., McSherry, E.A., Donatello, S., Hill, A.D., Hopkins, A.M., 2014. A novel mechanism of regulating breast cancer cell migration via palmitoylation-dependent alterations in the lipid raft affiliation of CD44. *Breast Cancer Res. BCR* 16, R19. doi:10.1186/bcr3614
- Bartels, D.J., Mitchell, D.A., Dong, X., Deschenes, R.J., 1999. Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6775–6787.
- Bhattacharyya, R., Barren, C., Kovacs, D.M., 2013. Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 11169–11183. doi:10.1523/JNEUROSCI.4704-12.2013
- Brigidi, G.S., Bamji, S.X., 2013. Detection of protein palmitoylation in cultured hippocampal neurons by immunoprecipitation and acyl-biotin exchange (ABE). *J. Vis. Exp. JoVE*. doi:10.3791/50031
- Calero, G., Gupta, P., Nonato, M.C., Tandel, S., Biehl, E.R., Hofmann, S.L., Clardy, J., 2003. The Crystal Structure of Palmitoyl Protein Thioesterase-2 (PPT2) Reveals the Basis for Divergent Substrate Specificities of the Two Lysosomal Thioesterases, PPT1 and PPT2. *J. Biol. Chem.* 278, 37957–37964. doi:10.1074/jbc.M301225200
- Camp, L.A., Hofmann, S.L., 1993. Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. *J. Biol. Chem.* 268, 22566–22574.
- Casey, P.J., Seabra, M.C., 1996. Protein Prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 271, 5289–5292. doi:10.1074/jbc.271.10.5289
- Cox, A.D., 2010. Protein localization: Can too much lipid glue stop Ras? *Nat. Chem. Biol.* 6, 483–485. doi:10.1038/nchembio.399
- Davda, D., Martin, B.R., 2014. Acyl protein thioesterase inhibitors as probes of dynamic S-palmitoylation. *MedChemComm* 5, 268–276. doi:10.1039/C3MD00333G
- Dekker, F.J., Rocks, O., Vartak, N., Menninger, S., Hedberg, C., Balamurugan, R., Wetzel, S., Renner, S., Gerauer, M., Schölermann, B., Rusch, M., Kramer, J.W., Rauh, D., Coates, G.W., Brunsveld, L., Bastiaens, P.I.H., Waldmann, H., 2010. Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat. Chem. Biol.* 6, 449–456. doi:10.1038/nchembio.362
- Demily, C., Legallic, S., Bou, J., Houy-Durand, E., Van Amelsvoort, T., Zinkstok, J., Manouvrier-Hanue, S., Vogels, A., Drouin-Garraud, V., Philip, N., Philippe, A., Héron, D., Sarda, P., Petit, M., Thibaut, F., Frébourg, T., Campion, D., 2007. ZDHHC8 single nucleotide polymorphism rs175174 is not associated with psychiatric features of the 22q11 deletion syndrome or schizophrenia. *Psychiatr. Genet.* 17, 311–312. doi:10.1097/YPG.0b013e328133f369
- Donatello, S., Babina, I.S., Hazelwood, L.D., Hill, A.D.K., Nabi, I.R., Hopkins, A.M., 2012. Lipid raft association restricts CD44-ezrin interaction and promotion of breast cancer cell migration. *Am. J. Pathol.* 181, 2172–2187. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.025
- Drisdell, R.C., Green, W.N., 2004. Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *BioTechniques* 36, 276–285.
- Duncan, J.A., Gilman, A.G., 1998. A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J. Biol. Chem.* 273, 15830–15837.
- Duncan, J.A., Gilman, A.G., 1996. Autoacylation of G protein alpha subunits. *J. Biol. Chem.* 271, 23594–23600.

- Emmer, B.T., Nakayasu, E.S., Souther, C., Choi, H., Sobreira, T.J.P., Epting, C.L., Nesvizhskii, A.I., Almeida, I.C., Engman, D.M., 2011. Global analysis of protein palmitoylation in African trypanosomes. *Eukaryot. Cell* 10, 455–463. doi:10.1128/EC.00248-10
- Farazi, T.A., Waksman, G., Gordon, J.I., 2001. The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276, 39501–39504. doi:10.1074/jbc.R100042200
- Feng, Y., Davis, N.G., 2000. Akr1p and the Type I Casein Kinases Act prior to the Ubiquitination Step of Yeast Endocytosis: Akr1p Is Required for Kinase Localization to the Plasma Membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5350–5359.
- Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A., LeBARON, N., 1951. Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.* 191, 833–841.
- Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R.A., Bredt, D.S., 2004. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron* 44, 987–996. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.005
- Fukata, Y., Dimitrov, A., Boncompain, G., Vielemeyer, O., Perez, F., Fukata, M., 2013. Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J Cell Biol* 202, 145–161. doi:10.1083/jcb.201302071
- Fukata, Y., Fukata, M., 2010. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 161–175. doi:10.1038/nrn2788
- Greaves, J., Gorleku, O.A., Salaun, C., Chamberlain, L.H., 2010. Palmitoylation of the SNAP25 protein family: specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *J. Biol. Chem.* 285, 24629–24638. doi:10.1074/jbc.M110.119289
- Grosenbach, D.W., Ulaeto, D.O., Hruby, D.E., 1997. Palmitoylation of the Vaccinia Virus 37-kDa Major Envelope Antigen IDENTIFICATION OF A CONSERVED ACCEPTOR MOTIF AND BIOLOGICAL RELEVANCE. *J. Biol. Chem.* 272, 1956–1964. doi:10.1074/jbc.272.3.1956
- Hannoush, R.N., Sun, J., 2010. The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation. *Nat. Chem. Biol.* 6, 498–506. doi:10.1038/nchembio.388
- He, M., Abdi, K.M., Bennett, V., 2014. Ankyrin-G palmitoylation and β II-spectrin binding to phosphoinositide lipids drive lateral membrane assembly. *J. Cell Biol.* 206, 273–288. doi:10.1083/jcb.201401016
- Ivaldi, C., Martin, B.R., Kieffer-Jaquinod, S., Chapel, A., Levade, T., Garin, J., Journet, A., 2012. Proteomic Analysis of S-Acylated Proteins in Human B Cells Reveals Palmitoylation of the Immune Regulators CD20 and CD23. *PLOS ONE* 7, e37187. doi:10.1371/journal.pone.0037187
- Jones, M.L., Collins, M.O., Goulding, D., Choudhary, J.S., Rayner, J.C., 2012. Analysis of Protein Palmitoylation Reveals a Pervasive Role in Plasmodium Development and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 12, 246–258. doi:10.1016/j.chom.2012.06.005
- Jung, V., Chen, L., Hofmann, S.L., Wigler, M., Powers, S., 1995. Mutations in the SHR5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* suppress Ras function and block membrane attachment and palmitoylation of Ras proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1333–1342.
- Kanaani, J., Diacovo, M.J., El-Husseini, A.E.-D., Bredt, D.S., Baekkeskov, S., 2004. Palmitoylation controls trafficking of GAD65 from Golgi membranes to axon-specific endosomes and a Rab5a-dependent pathway to presynaptic clusters. *J. Cell Sci.* 117, 2001–2013. doi:10.1242/jcs.01030
- Kang, R., Wan, J., Arstikaitis, P., Takahashi, H., Huang, K., Bailey, A.O., Thompson, J.X., Roth, A.F., Drisdell, R.C., Mastro, R., Green, W.N., Yates, J.R., Davis, N.G., El-Husseini, A., 2008. Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 456, 904–909. doi:10.1038/nature07605
- Kaul, S., Mittal, S.K., Feigenbaum, L., Kruhlak, M.J., Roche, P.A., 2015. Expression of the SNARE protein SNAP-23 is essential for cell survival. *PloS One* 10, e0118311. doi:10.1371/journal.pone.0118311

- Karnovsky J.M., Kleinfeld A.M., Hoover R.L., Klausner R.D. The concept of lipid domains in membranes, 1982. *J. Cell Biol.* 94, 1–6
- Kennedy, M.B., 2000. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290, 750–754.
- Kim, S.-J., Zhang, Z., Sarkar, C., Tsai, P.-C., Lee, Y.-C., Dye, L., Mukherjee, A.B., 2008. Palmitoyl protein thioesterase-1 deficiency impairs synaptic vesicle recycling at nerve terminals, contributing to neuropathology in humans and mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3075–3086. doi:10.1172/JCI33482
- Kong, E., Peng, S., Chandra, G., Sarkar, C., Zhang, Z., Bagh, M.B., Mukherjee, A.B., 2013. Dynamic palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene H-ras product and growth-associated protein-43. *J. Biol. Chem.* 288, 9112–9125. doi:10.1074/jbc.M112.421073
- Kostiuk, M.A., Corvi, M.M., Keller, B.O., Plummer, G., Prescher, J.A., Hangauer, M.J., Bertozzi, C.R., Rajaiah, G., Falck, J.R., Berthiaume, L.G., 2008. Identification of palmitoylated mitochondrial proteins using a bio-orthogonal azido-palmitate analogue. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 721–732. doi:10.1096/fj.07-9199com
- Lanyon-Hogg, T., Masumoto, N., Bodakh, G., Konitsiotis, A.D., Thinon, E., Rodgers, U.R., Owens, R.J., Magee, A.I., Tate, E.W., 2015. Click chemistry armed enzyme-linked immunosorbent assay to measure palmitoylation by hedgehog acyltransferase. *Anal. Biochem.* 490, 66–72. doi:10.1016/j.ab.2015.08.025
- Lee, A.G., Birdsall, N.J., Metcalfe, J.C., Toon, P.A., Warren, G.B., 1974. Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes. *Biochemistry (Mosc.)* 13, 3699–3705.
- Lemonidis, K., Sanchez-Perez, M.C., Chamberlain, L.H., 2015. Identification of a Novel Sequence Motif Recognized by the Ankyrin Repeat Domain of zDHHC17/13 S-Acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 290, 21939–21950. doi:10.1074/jbc.M115.657668
- Li, L., Dong, L., Xia, L., Li, T., Zhong, H., 2011. Chemical and genetic probes for analysis of protein palmitoylation. *J. Chromatogr. B, ENHANCEMENT OF ANALYSIS BY ANALYTICAL DERIVATIZATION* 879, 1316–1324. doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.018
- Li, S.-X., Tang, G.-S., Zhou, D.-X., Pan, Y.-F., Tan, Y.-X., Zhang, J., Zhang, B., Ding, Z.-W., Liu, L.-J., Jiang, T.-Y., Hu, H.-P., Dong, L.-W., Wang, H.-Y., 2014. Prognostic significance of cytoskeleton-associated membrane protein 4 and its palmitoyl acyltransferase DHHC2 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 120, 1520–1531. doi:10.1002/cncr.28593
- Linder, M.E., Deschenes, R.J., 2007. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 74–84. doi:10.1038/nrm2084
- Magee, A.I., Gutierrez, L., McKay, I.A., Marshall, C.J., Hall, A., 1987. Dynamic fatty acylation of p21N-ras. *EMBO J.* 6, 3353–3357.
- Martin, B.R., Cravatt, B.F., 2009. Large-Scale Profiling of Protein Palmitoylation in Mammalian Cells. *Nat. Methods* 6, 135–138. doi:10.1038/nmeth.1293
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., 2005. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biol.* 6, R55. doi:10.1186/gb-2005-6-6-r55
- Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G., Brown, D.A., 1999. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.* 274, 3910–3917.
- Mitchell, D.A., Hamel, L.D., Ishizuka, K., Mitchell, G., Schaefer, L.M., Deschenes, R.J., 2012. The Erf4 Subunit of the Yeast Ras Palmitoyl Acyltransferase Is Required for Stability of the Acyl-Erf2 Intermediate and Palmitoyl Transfer to a Ras2 Substrate. *J. Biol. Chem.* 287, 34337–34348. doi:10.1074/jbc.M112.379297
- Mitchell, D.A., Vasudevan, A., Linder, M.E., Deschenes, R.J., 2006. Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J. Lipid Res.* 47, 1118–1127. doi:10.1194/jlr.R600007-JLR200

- Moffett, S., Brown, D.A., Linder, M.E., 2000. Lipid-dependent Targeting of G Proteins into Rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 2191–2198. doi:10.1074/jbc.275.3.2191
- Montoro, A.G., Quiroga, R., Taubas, J.V., 2013. Zinc co-ordination by the DHHC cysteine-rich domain of the palmitoyltransferase Swf1. *Biochem. J.* 454, 427–435. doi:10.1042/BJ20121693
- Mukai, J., Liu, H., Burt, R.A., Swor, D.E., Lai, W.-S., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2004. Evidence that the gene encoding ZDHHC8 contributes to the risk of schizophrenia. *Nat. Genet.* 36, 725–731. doi:10.1038/ng1375
- Munday, A.D., López, J.A., 2007. Posttranslational Protein Palmitoylation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1496–1499. doi:10.1161/ATVBAHA.106.136226
- Pedram, A., Razandi, M., Deschenes, R.J., Levin, E.R., 2012. DHHC-7 and -21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors. *Mol. Biol. Cell* 23, 188–199. doi:10.1091/mbc.E11-07-0638
- Peng, C., Zhang, Z., Wu, J., Lv, Z., Tang, J., Xie, H., Zhou, L., Zheng, S., 2014. A Critical Role for ZDHHC2 in Metastasis and Recurrence in Human Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/832712
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., Galdes, A., 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037–14045.
- Prescott, G.R., Gorleku, O.A., Greaves, J., Chamberlain, L.H., 2009. Palmitoylation of the synaptic vesicle fusion machinery. *J. Neurochem.* 110, 1135–1149. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06205.x
- Putilina, T., Wong, P., Gentleman, S., 1999. The DHHC domain: a new highly conserved cysteine-rich motif. *Mol. Cell. Biochem.* 195, 219–226.
- Resh, M.D., 2017. Palmitoylation of proteins in cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 409–416. doi:10.1042/BST20160233
- Resh, M.D., 2013. Covalent Lipid Modifications of Proteins. *Curr. Biol. CB* 23, R431–R435. doi:10.1016/j.cub.2013.04.024
- Resh, M.D., 2004. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell. Biochem.* 37, 217–232.
- Resh, M.D., 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1451, 1–16. doi:10.1016/S0167-4889(99)00075-0
- Resh, M.D., 1996. Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell. Signal.* 8, 403–412. doi:10.1016/S0898-6568(96)00088-5
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., Bastiaens, P.I.H., 2005. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307, 1746–1752. doi:10.1126/science.1105654
- Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., Phinney, B.S., Yates, J.R., Davis, N.G., 2006. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 125, 1003–1013. doi:10.1016/j.cell.2006.03.042
- Rusch, M., Zimmermann, T.J., Bürger, M., Dekker, F.J., Görmer, K., Triola, G., Brockmeyer, A., Janning, P., Böttcher, T., Sieber, S.A., Vetter, I.R., Hedberg, C., Waldmann, H., 2011. Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 50, 9838–9842. doi:10.1002/anie.201102967
- Salaun, C., Greaves, J., Chamberlain, L.H., 2010. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell Biol.* 191, 1229–1238. doi:10.1083/jcb.201008160

- Sanders, S.S., Hayden, M.R., 2015. Aberrant palmitoylation in Huntington disease. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 205–210. doi:10.1042/BST20140242
- Sanders, S.S., Martin, D.D.O., Butland, S.L., Lavallée-Adam, M., Calzolari, D., Kay, C., Iii, J.R.Y., Hayden, M.R., 2015. Curation of the Mammalian Palmitoylome Indicates a Pivotal Role for Palmitoylation in Diseases and Disorders of the Nervous System and Cancers. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004405. doi:10.1371/journal.pcbi.1004405
- Schmidt, M.F., Bracha, M., Schlesinger, M.J., 1979. Evidence for covalent attachment of fatty acids to Sindbis virus glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1687–1691.
- Segal-Salto, M., Sapir, T., Reiner, O., 2016. Reversible Cysteine Acylation Regulates the Activity of Human Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 (PPT1). *PloS One* 11, e0146466. doi:10.1371/journal.pone.0146466
- Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P.F., Busch, C.J.L., Kane, C., Hübel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M.E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J., Schratt, G.M., 2009. A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* 11, 705–716. doi:10.1038/ncb1876
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39. doi:10.1038/35036052
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720–731. doi:10.1126/science.175.4023.720
- Soyombo, A.A., Hofmann, S.L., 1997. Molecular Cloning and Expression of Palmitoyl-protein Thioesterase 2 (PPT2), a Homolog of Lysosomal Palmitoyl-protein Thioesterase with a Distinct Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* 272, 27456–27463. doi:10.1074/jbc.272.43.27456
- Sugimoto, H., Hayashi, H., Yamashita, S., 1996. Purification, cDNA cloning, and regulation of lysophospholipase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 271, 7705–7711.
- Tomatis, V.M., Trenchi, A., Gomez, G.A., Daniotti, J.L., 2010. Acyl-protein thioesterase 2 catalyzes the deacylation of peripheral membrane-associated GAP-43. *PloS One* 5, e15045. doi:10.1371/journal.pone.0015045
- Topinka, J.R., Brecht, D.S., 1998. N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron* 20, 125–134.
- Varner, A.S., Ducker, C.E., Xia, Z., Zhuang, Y., De Vos, M.L., Smith, C.D., 2003. Characterization of human palmitoyl-acyl transferase activity using peptides that mimic distinct palmitoylation motifs. *Biochem. J.* 373, 91–99. doi:10.1042/BJ20021598
- Verkruyse, L.A., Hofmann, S.L., 1996. Lysosomal Targeting of Palmitoyl-protein Thioesterase. *J. Biol. Chem.* 271, 15831–15836. doi:10.1074/jbc.271.26.15831
- Vesa, J., Hellsten, E., Verkruyse, L.A., Camp, L.A., Rapola, J., Santavuori, P., Hofmann, S.L., Peltonen, L., 1995. Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* 376, 584–587. doi:10.1038/376584a0
- Wan, J., Roth, A.F., Bailey, A.O., Davis, N.G., 2007. Palmitoylated proteins: purification and identification. *Nat. Protoc.* 2, 1573–1584. doi:10.1038/nprot.2007.225
- Wedegaertner, P.B., Bourne, H.R., 1994. Activation and depalmitoylation of Gs alpha. *Cell* 77, 1063–1070.
- Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R.R., Arstikaitis, P., Gan, L., Orban, P.C., Mullard, A., Cowan, C.M., Raymond, L.A., Drisdell, R.C., Green, W.N., Ravikumar, B., Rubinstein, D.C., El-Husseini, A., Hayden, M.R., 2006. Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat. Neurosci.* 9, 824–831. doi:10.1038/nn1702

- Yeh, D.C., Duncan, J.A., Yamashita, S., Michel, T., 1999. Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin. *J. Biol. Chem.* 274, 33148–33154.
- Zeidman, R., Jackson, C.S., Magee, A.I., 2009. Protein acyl thioesterases (Review). *Mol. Membr. Biol.* 26, 32–41. doi:10.1080/09687680802629329
- Zhang, W., Tribble, R.P., Samelson, L.E., 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239–246.